

Reference 16

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-046120

(43)Date of publication of application : 17.02.1992

(51)Int.Cl.

A61K 31/395  
 A61K 31/395  
 A61K 31/395  
 C12P 17/18  
 // C07D227/12

(21)Application number : 02-152099

(22)Date of filing : 11.06.1990

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

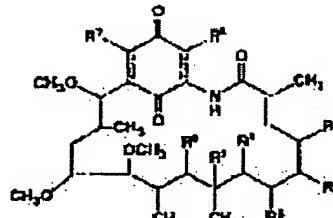
(72)Inventor : SANO HIROSHI  
 TAMAOKI TATSUYA  
 OMURA SATOSHI

## (54) ARTERIALIZATION INHIBITING AGENT

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a low toxic arterialization-inhibiting agent containing a herbimycin derivative as an active ingredient.

CONSTITUTION: The objective agent contains a compound of formula I (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> are Cl, or both are bonded to each other, when R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> are Cl, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> both are bonded to each other, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> are H; when R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are bonded to each other, R<sub>3</sub> is OCH<sub>3</sub>, Cl, R<sub>7</sub> is H, group of formula II, R<sub>3</sub> is H, Br, R<sub>4</sub> is OCONH<sub>2</sub>, R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> form O or a bond together, or R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> form O-CO-O together and R<sub>6</sub> is Br) as an active ingredient. The compound is useful for preventing or treating various diseases caused by the abnormal multiplication of blood vessels, such as rheumatic arthritis, diabetic retinopathy, immature baby retinopathy, senile macular degeneration and excessive cicarrix formation when wound is healed.



Rep. 16

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平4-46120

⑫ Int. Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 31/395

C 12 P 17/18  
// C 07 D 227/12

識別記号

A B G  
A B E  
A B L

庁内整理番号

7475-4C  
8931-4B  
6701-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)2月17日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 血管新生抑制剤

⑮ 特 願 平2-152099

⑯ 出 願 平2(1990)6月11日

⑰ 発明者 佐野 浩 東京都町田市玉川学園7-19-16

⑰ 発明者 玉沖 達也 東京都町田市本町田2662-13

⑰ 発明者 大村 智 東京都世田谷区瀬田5-12-7

⑰ 出願人 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

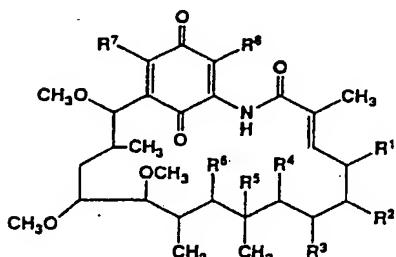
### 明細書

#### 1. 発明の名称

血管新生抑制剤

#### 2. 特許請求の範囲

一般式 (I)



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>はC<sub>2</sub>または一緒になって結合を表わし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>がC<sub>2</sub>の場合、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ一緒になって結合を表わし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>はHを表わす。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が一緒になって結合を表わす場合、R<sup>3</sup>はOCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>を表わし、R<sup>7</sup>はHまたはNH-△を表わし、R<sup>4</sup>はHまたはBrを表わし、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>およびR<sup>6</sup>は、R<sup>5</sup>がOCOCONH<sub>2</sub>の

場合R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は一緒になって-o-または結合を表わし、R<sup>4</sup>およびR<sup>6</sup>が一緒になって-O-CO-O-を表わす場合、R<sup>6</sup>はBrを表わす。)で表わされるハービマイシン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤。

#### 3. 発明の詳細な説明

##### 産業上の利用分野

本発明は、血管新生抑制剤に関する。血管新生抑制剤は、血管の異常増殖によって発症する疾患、たとえばリュウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人性黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成の予防または治療薬として期待される。

##### 従来の技術

血管新生抑制作用を有する物質としては、たとえばメドロキシプロゲステロン、硫酸化多糖体、牛軟骨粗抽出液などが知られており、またコチゾンとヘパリンの併用によって、血管新生を抑制することができることも知られている。

ハービマイシンはアンサマイシン系抗生物質に分類される抗生物質で除草活性、抗タバコモザイクビールス活性およびP388ロイケミア、B16

メラノーマ、L1210 ロイケミア、ルイス・ラング・カルシノーマ、エーリッヒ・アサイテス・カルシノーマなどを用いたマウス実験動物系において抗腫瘍活性を示すことが知られている。ある種のハーピマイシンの誘導体がエーリッヒ・アサイテス・カルシノーマを用いたマウス実験動物系において抗腫瘍活性を有することが知られている〔ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics) 37, 1264(1984); 39, 415 (1986)〕。

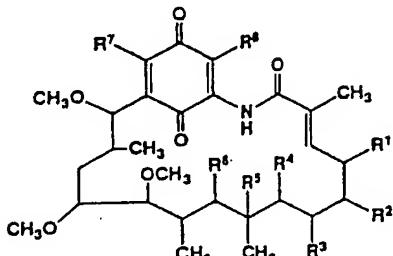
また、ハーピマイシンAおよびその誘導体が癌化した細胞を正常の細胞に分化させることができて〔モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 6, 2198(1986), ジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics), 41, 831(1988)〕。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明によれば、一般式 (I)

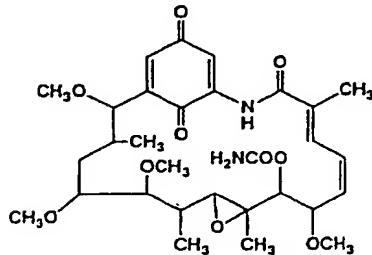


(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>はC<sub>2</sub>または一緒にあって結合を表わし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>がC<sub>2</sub>の場合、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ一緒にあって結合を表わし、R<sup>7</sup>およびR<sup>8</sup>はHを表わす。R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が一緒にあって結合を表わす場合、R<sup>3</sup>はOCH<sub>3</sub>またはC<sub>2</sub>を表わし、R<sup>7</sup>はHまたはNH—<を表わし、R<sup>8</sup>はHまたはBrを表わし、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、R<sup>4</sup>がOC(=O)NH<sub>2</sub>の場合R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は一緒にあって-o-または結合を表わし、R<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>が一緒にあって-O-CO-O-を表わす場合、R<sup>6</sup>はBrを表わす。)で表わされるハーピマイシン誘導体を有効成分とする血管新生抑制剤

を提供する。

以下に、化合物 (I) の具体例およびそれぞれの物理化学的性質を示す。

#### (I) 化合物 I - 1



TLC R<sub>f</sub> 値 : 0.51 (ベンゼン : 酢酸エチル = 1:1)

融点 : 138°C

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +126.0° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル : λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>2</sub>OH</sup> nm (ε) 272 (23,900)

マススペクトル : m/z 590 (M<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>)

水素核磁気共鳴スペクトル (CDCl<sub>3</sub> 中) : δ (ppm)

6.98 (1H, dd, J = ~1.0, 11.5Hz), 6.59 (1H, dd,

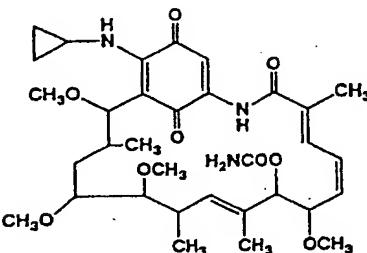
J = 2.0, 2.0Hz), 6.46 (1H, dd, J = 11.5, 11.5Hz),

5.80 (1H, dd, J = 11.5, 11.5Hz), 4.56 (1H, d, J =

11.5Hz), 4.17 (1H, s), 2.96 (1H, d, J = 9.0Hz),

1.33 (3H, t)

#### (2) 化合物 I - 2



TLC R<sub>f</sub> 値 : 0.60 (ベンゼン : 酢酸エチル = 1:1)

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -138.0° (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>)

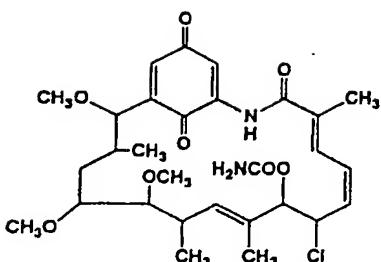
紫外線吸収スペクトル : λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>2</sub>OH</sup> nm (ε) 245 (12,000)

マススペクトル : m/z 629 (M<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>)

水素核磁気共鳴スペクトル (CDCl<sub>3</sub> 中) : δ (ppm)

7.60 (1H, brd), 6.48 (1H, s), 4.48 (1H, brs)

## (3) 化合物 I - 3

TLC R<sub>f</sub> 値 : 0.63 (ベンゼン : アセトン = 7:3)

融点 : 188°C (分解)

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +54° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)紫外線吸収スペクトル : λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>3</sub>OH</sup> nm (ε) 232 (18,500)

高分解能マススペクトル : m/z 578.239

(C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>としての計算値 578.239)水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub> 中) :

δ (ppm) 7.23 (1H, d, J=2.3Hz), 6.60 (1H, dd, J=2.3, 3.0Hz), 5.89 (1H, dd, J=7.61, 1.6Hz), 5.80 (1H, brs), 5.51 (1H, qd, J=1.0, 7.1Hz), 5.10 (1H, brd, J=7.6Hz), 4.50 (1H, d, J=3.0Hz), 1.66 (3H, d, J=1.1Hz)

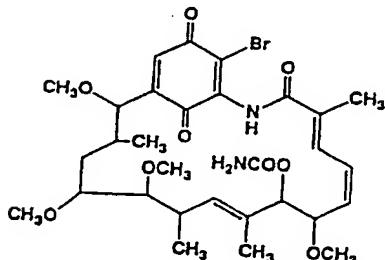
J=2.7, 10.6Hz), 4.66 (1H, dd, J=2.7, 9.8Hz), 1.75 (3H, d, J=1.3Hz)

元素分析 : C 60.28, H 6.98, N 2.45, Cl 12.89

C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>としての計算値 :

C 60.74, H 6.74, N 2.53, Cl 12.64

## (5) 化合物 I - 5

TLC R<sub>f</sub> 値 : 0.45 (ベンゼン : アセトン = 7:3)

融点 : 178°C (分解)

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +93° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)紫外線吸収スペクトル : λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>3</sub>OH</sup> nm (ε) 258 (18,600)水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub> 中) :

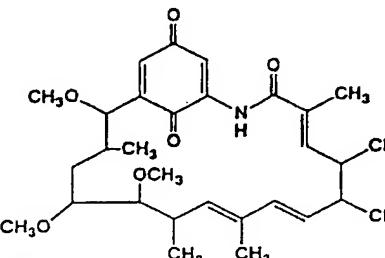
δ (ppm) 6.92 (1H, d, J=0.9Hz), 6.42 (1H, qd, J=1.1, 11.5Hz), 6.32 (1H, dd, J=11.5,

元素分析 : C 60.01, H 6.92, N 4.71, Cl 5.89

C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> としての計算値 :

C 60.18, H 6.80, N 4.84, Cl 6.05

## (4) 化合物 I - 4

TLC R<sub>f</sub> 值 : 0.80 (ベンゼン : アセトン = 7:3)

融点 : 199°C (分解)

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +99° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)紫外線吸収スペクトル : λ<sub>max</sub><sup>CH<sub>3</sub>OH</sup> nm (ε) 271 (23,500)

高分解能マススペクトル : m/z 553.200

(C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>としての計算値 553.200)水素核磁気共鳴スペクトル(CDCl<sub>3</sub> 中) :

δ (ppm) 7.33 (1H, d, J=2.5Hz), 6.63 (1H, dd, J=2.0, 2.5Hz), 6.55 (1H, d, J=13.5Hz), 5.86 (1H, dd, J=9.8, 13.5Hz), 4.99 (1H, dd,

J=2.7, 10.6Hz), 4.66 (1H, dd, J=2.7, 9.8Hz), 1.75 (3H, d, J=1.3Hz)

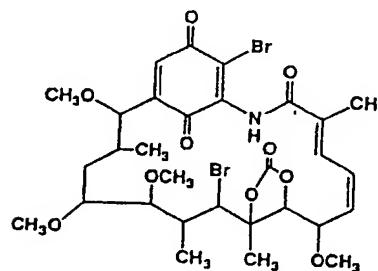
11.5Hz), 5.30 (1H, dd, J=10.6, 11.5Hz), 5.28 (1H, qd, J=1.0, 9.8Hz), 5.03 (1H, d, J=9.4Hz), 4.49 (1H, dd, J=0.9Hz), 4.00 (1H, dd, J=9.1, 10.6Hz), 3.18 (1H, dd, J=1.8, 10.0Hz), 2.25 (1H, m), 1.26 (3H, d, J=1.0Hz)

元素分析 : C 54.89, H 6.32, N 4.26, Br 12.68

C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> としての計算値 :

C 55.20, H 6.34, N 4.29, Br 12.10

## (6) 化合物 I - 6

TLC R<sub>f</sub> 值 : 0.84 (ベンゼン : アセトン = 7:3)

融点 : 132°C (分解)

旋光度 : [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +83° (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

紫外線吸収スペクトル :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$  nm ( $\epsilon$ ) 268 (18,000)

水素核磁気共鳴スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 中) :

$\delta$  (ppm) 7.28 (1H, qd,  $J=1.2, 12.2\text{Hz}$ ), 6.81 (1H, d,  $J=1.6\text{Hz}$ ), 4.61 (1H, d,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 4.47 (1H, s), 4.32 (1H, d,  $J=9.4\text{Hz}$ ), 2.32 (1H, m), 1.83 (3H, s)

元素分析 : C 48.97, H 5.31, N 1.93, Br 21.69

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{BrNO}_3$  としての計算値 :

C 49.24, H 5.38, N 1.92, Br 21.16

化合物 I-1 および I-2 は特開昭63-218620

号公報に、化合物 I-3 ~ I-6 はジャーナル・オブ・アンタイバイオティクス (J. Antibiotics), 39, 415 (1986) にそれぞれ製造法とともに記載されている公知物質である。

化合物 (I) は投与の目的および方法により、常法により調製された錠剤、顆粒剤、粉剤、カプセル剤、シロップ剤、軟膏剤、クリーム剤、注射剤などの形で投与することができる。とくに注射剤の形で用いるのが好ましい。注射剤として用いる場合、生理食塩水、ブドウ糖、ラクトース、マ

れも  $\text{LD}_{50} > 200 \text{ mg/kg}$  であった。

#### 試験例 2

鶏受精卵の漿尿膜内の血管新生に対する抑制作用

エヌ・タナカラの方法 [エクスペリメンタル・パソロジー (Experimental Pathology) 30, 143 (1986)] に従い、鶏受精卵の漿尿膜内の血管新生に対する化合物 (I) の作用を調べた。

10 ~ 20 個の4.5日齢の鶏の受精卵に小穴を開け、漿尿膜上に酢酸ビニルーエチレン共重合体 (EV40 ; 三井デュポン社製) に封入した試験化合物を設置し、37℃で2日間孵卵器内で培養後、10% のゴマ油乳剤 [イントラリポス (intralipos); ミドリ十字社製] 1mL を漿尿膜内に注入し、漿尿膜内に新生される血管に対する試験化合物の抑制作用の程度を観察した。

すなわち、血管形成の認められない領域が 3 mm 以上の卵を完全抑制を示した卵とし、抑制率を次式で算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{完全抑制を示した卵の数 (個)}}{\text{全卵数 (個)}} \times 100$$

ンニット注射液に適当な界面活性剤たとえば Tween® 80 を助剤として加えそこへ化合物 (I) を懸濁させ、これを 1 ~ 1000mg/kg、1 日 1 ~ 3 回で静脈内あるいは局所に投与する。

化合物 (I) は血管新生作用を有し、ハーピマイシン A と比較して低毒性である。また化合物の一部はハーピマイシン A が示すような既存の血管に対する作用がないことから、血管の異常増殖によって発症する種々の疾患たとえば、リュウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人性黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成などに有用である。次に化合物 (I) の毒性および薬理作用について、試験例で説明する。

#### 試験例 1

##### 急性毒性試験

6 遇齢、雄の D D Y マウス ( $25 \pm 1\text{ g}$ 、1群3匹) に、2% のアラビアゴムを含む生理食塩水に懸濁した試験化合物を腹腔内に投与し、24時間後の生存率から 50% 生存投与量 ( $\text{LD}_{50}$ ) を上げ下げ法で算出した結果、化合物 (I) はいず

またフィッシャー (Fischer) の正確確立法により  $p$  値を求めた。いずれのデータも  $p$  値は 0.05 以下であった。

その結果を第 1 表に示す。第 1 表に示したように、本発明の化合物は、0.01 ~ 10 mg/個の投与で、有意な血管新生抑制作用が認められた。

#### 試験例 3

##### 既存の血管に対する作用実験

10 日目の孵卵を用いて試験例 2 と同様にして試験化合物を設置、培養し、漿尿膜内にすでに形成されている血管に対する作用を調べた。既存の血管の消失が観察されるものを +、変化がないものを - として第 1 表に示す。

第 1 表

化合物	投与量 (mg/個)	抑制率 (%)	既存血管に 対する作用
I - 1	0.1	12	+
	1	100	
	10	100	
I - 2	0.01	20	+
	0.1	50	
	1	80	
	10	100	
I - 3	0.1	12	+
	1	50	
	10	100	
I - 4	0.1	12	+
	1	65	
	10	100	
I - 5	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	35	
	10	30	
I - 6	0.01	10	-
	0.1	30	
	1	30	
	10	30	
ハーピマイ シンA	0.01	0	+
	0.1	50	
	1	100	

以下に本発明を実施例で示す。

## 実施例 注射剤

化合物(I-1)の200gをエタノール20mlに溶解した後、ミリポアフィルター(孔径0.22μ)で加圧沪過して無菌化をおこなう。得られる無菌沪液5.0mlを褐色バイアルに分注し、常法により凍結乾燥し、50mg/バイアルの凍結乾燥剤を得る。

## 発明の効果

本発明により、医薬品として有用な新しい血管新生抑制剤が提供される。

特許出願人(102) 協和醸酵工業株式会社

代表者 加藤幹夫  
